

血浆抗凝血酶Ⅲ、绒毛蛋白1和凝集素含量在维吾尔族妇女宫颈病变进程中的动态变化及意义



郭霞¹, 玛依拉·卡米力江¹, 伊力努尔·沙比提², 刘开江², 阿仙姑·哈斯木³, 哈丽丹·热依木¹, Abulizi·Abudula¹

Correlation of Dynamic Changes of Candidate Plasma Proteins Expression with Development of Cervical Carcinogenesis in Uyghur Women

GUO Xia¹, Mayila·Kamilijiang¹, Yiliner·Shabiti², LIU Kaijiang², Axiangu·Hasimu³, Halidan·Reyimu², Abulizi·Abudula¹

1. Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases, Urumqi 830011, China; 2. The Affiliated Tumor Hospital Xinjiang Medical University; 3. Department of Pathology, Xinjiang Medical University

Corresponding Author: Abulizi·Abudula, E-mail: abulizi_de@126.com

Abstract: Objective To explore the relationships of the dynamic changes of candidate plasma proteins expression with the development of cervical carcinogenesis in Uyghur women based on the previous plasma proteomic research. **Methods** We collected 82 cases of plasma samples from Uyghur women, 20 cases with cervicitis (CV), 20 cases with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) II-III, 20 cases with early stage (I-II) and 20 cases with advanced stage (IIB-IV) cervical squamous cell carcinoma, quantitatively determined the content of plasma proteins ATIII, VIL1 and CLU by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and statistical analysis, and evaluated the specificity and sensitivity of candidate plasma protein markers. **Results** With the development of cervicitis to CIN II-III, early stage or advanced stage cervical cancer, the changes of these plasma proteins altered gradually, with remarkably decrease in the content of ATIII, and increase of VIL1 and CLU, with statistical differences ($P<0.05$). Compared with cervicitis group, there were significant differences of the content of plasma proteins ATIII, VIL1 and CLU in CINII-III, early stage or advanced stage cervical cancer group ($P<0.05$). Correlation analysis of these three protein indicators showed no correlation ($P>0.05$). By the detection of ATIII, VIL1 and CLU in the cervical lesions, generally the sensitivity, specificity and accuracy of the ATIII protein were the highest (73.0%, 72.0%, 73.0%), VIL1 were the next (65.0%, 57.0%, 54.0%), and CLU were the lowest (60.0%, 59.0%, 59.0%). **Conclusion** The content of plasma proteins ATIII, VIL1 and CLU is an important symbol of the process of cervical lesions, and has high predictive value. It is expected to be the early diagnosis of cervical cancer.

Key words: Uyghur women; Cervical carcinogenesis development; Antitrombin(ATIII); Villin1(VIL1); Clusterin(CLU); Plasma biomarker

摘要: 目的 根据前期工作中运用血浆蛋白质组学研究筛选出的一系列血浆候选差异蛋白指标, 探索血浆中ATⅢ、VIL1和CLU表达含量在维吾尔族妇女宫颈病变进程中动态变化。**方法** 收集82例新疆地区维吾尔族宫颈病变血浆样本(宫颈炎22例, CINⅡ~Ⅲ20例, 宫颈癌早期20例, 宫颈癌晚期20例), 用酶联免疫法检测血浆中ATⅢ、VIL1和CLU的表达含量, 分析其与宫颈病变进程的关系及相关性。**结果** ATⅢ的表达含量随着宫颈病变进程逐渐下降, CLU和VIL1的表达含量随着宫颈病变的进程逐渐升高($P<0.05$)。以宫颈炎组作为对照组, ATⅢ、VIL1和CLU的表达含量与CINⅡ~Ⅲ组、宫颈癌早期组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。ATⅢ、VIL1和CLU表达含量之间的动态变化关联性分析差异无统计学意义。**结论** 维吾尔族妇女宫颈癌发生发展与ATⅢ、VIL1和CLU的

收稿日期: 2013-05-14; 修回日期: 2013-10-17
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260380); 新疆维吾尔自治区重点实验室基金项目(XJDX0208-2008-03)
作者单位: 1.830011 乌鲁木齐, 新疆医科大学新疆地方病分子生物学重点实验室; 2.新疆医科大学附属肿瘤医院; 3.新疆医科大学基础医学院病理教研室
通信作者: Abulizi·Abudula, E-mail: abulizi_de@126.com
作者简介: 郭霞(1980-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事宫颈癌的发病机制与预警研究

表达含量动态变化密切相关, 可成为宫颈癌早期诊断的血浆候选预警蛋白标志物。
关键词: 维吾尔族妇女; 宫颈病变进程; 抗凝血酶Ⅲ; 绒毛蛋白1; 凝集素; 血浆生物标志物
中图分类号: R737.33
文献标识码: A

0 引言

新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌发病率及死亡率高，因此被列为新疆高发肿瘤之一^[1-4]。前期研究利用二维液相色谱和质谱技术，通过维吾尔族妇女宫颈癌血浆蛋白质学研究，发现多种可能与宫颈癌密切相关的血浆差异蛋白，通过生物学信息学IPA[®]和Meta Core[™]分析平台最终确定了4种候选血浆生物标志蛋白(数据待发表)，分别是抗凝血酶Ⅲ（AntithrombinⅢ，ATⅢ）、绒毛蛋白1（Villin1，VIL1）、凝集素（Clusterin，CLU）和免疫球蛋白（immunoglobulin kappa locus，IGK[@]）。但是，针对此高通量筛选的结果，必须对其表达含量动态变化与宫颈病变进程的关系进行验证，才能正确评价这些差异血浆蛋白指标作为宫颈癌早期预警指标的可能性和可行性。故本研究拟利用酶联免疫吸附法（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA），通过对上述候选血浆蛋白指标的定量分析，探讨宫颈病变进程与血浆蛋白含量动态变化的关系，确立早期诊断的血浆蛋白指标。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集新疆医科大学附属肿瘤医院在2011年1月至2012年1月期间经病理确诊的宫颈病变患者血浆标本共82例，其中宫颈炎（cervicitis）22例；CINⅡ~Ⅲ（cervical intraepithelial neoplasia）患者20例；按2009年FIGO临床分期标准，选择临床分期为Ⅰ~ⅡA的早期宫颈鳞状细胞癌（cervical squamous cell carcinoma，CSCC）患者血浆标本20例；ⅡB~Ⅳ期肿瘤晚期CSCC患者的血浆标本20例。患者年龄分布为25~65岁，平均年龄为53±6.78岁。患者无子宫切除或骨盆放射治疗史以及无呼吸系统、心血管和代谢性疾病等其他严重疾病。与患者签署知情同意书，采集治疗前（肿瘤手术切除、放化疗等）清晨空腹血液2~3 ml、离心分离血浆(358 g，10 min)、置于-80℃冰箱保存备用。

1.2 主要试剂与仪器

表1 宫颈病变进程与血浆ATⅢ、VIL1和CLU表达含量动态变化的关系（ELISA分析, $\bar{x}\pm s$ ）

Groups	Cases	ATⅢ（μg/ml）	F	P	CLU（μg/ml）	F	P	VIL1（ng/ml）	F	P
Cervicitis	22	533.963±210.452			169.065±59.041			105.662±44.107		
CINⅡ-Ⅲ	20	405.617±208.785*			235.773±62.403*			129.579±26.049*		
Early stage CSCC	20	357.661±174.334**			249.462±101.827*			137.325±37.621**		
Advanced stage CSCC	20	230.547±173.667**	8.60	0.00	210.375±102.114	3.80	0.02	138.169±39.794**	3.47	0.02

Notes: *: $P<0.05$ vs. cervicitis; **: $P<0.01$ vs. cervicitis

人ATⅢ、VIL1、CLU的双抗体夹心酶联免疫吸附定量测定试剂盒购自中国武汉优尔生科技股份有限公司。市场尚无IGK[@]蛋白的试剂盒和抗体供应，因此无法检测。酶标仪（Model 680）为美国Bio-Rad公司产品。

1.3 实验方法

按照酶联免疫试剂盒说明书流程操作，首先稀释标准品，依次倍比稀释成8 000 ng/ml、4 000 ng/ml、2 000 ng/ml、1 000 ng/ml、500 ng/ml、250 ng/ml、125 ng/ml，标准品稀释液（0 ng/ml）直接作为空白孔(不同蛋白的标准品稀释方法不同)。之后将血浆标本按说明书建议稀释。设标准孔、待测样品孔、空白孔，分别加入100 μl样品和标准品，酶标板加上覆膜，37℃温育2 h。分别加入A、B工作液，重复洗版。最后加底物溶液90 μl，覆膜，37℃避光显色10~15 min。加终止溶液50 μl终止反应。酶标仪在450 nm波长下测定吸光度值。

1.4 统计学方法

运用SPSS17.0软件进行数据录入和统计分析，血浆载脂蛋白水平实验数据采用单因素方差分析；两变量之间关系采用相关性分析， $P<0.05$ 为差异有统计学意义， $r<0.4$ 为低度相关， $\geq 0.4\sim 0.7$ 为中度相关， >0.7 为高度相关。

2 结果

2.1 宫颈病变进程与血浆ATⅢ、VIL1和CLU的表达含量动态变化的关系

ATⅢ表达含量随着宫颈病变进程逐渐下降，见图1A、表1，CINⅡ~Ⅲ组较宫颈炎组差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），且与宫颈癌早期及晚期组比较差异有统计学意义（ $P<0.01$ ）；CLU和VIL1表达含量随着宫颈病变进程逐渐增高，CLU的表达含量在CINⅡ~Ⅲ组、宫颈癌早期组逐渐升高，与宫颈炎组（对照组）相比，差异均有统计学意义（ $P<0.05$ ），见图1C。VIL1的表达含量在CINⅡ~Ⅲ组、宫颈癌早期组和宫颈癌晚期组也逐渐升高（ $P<0.05$ ），并且在宫颈癌早期组和宫颈癌晚期组间差异有统计学意义（ $P<0.01$ ），见图1B。

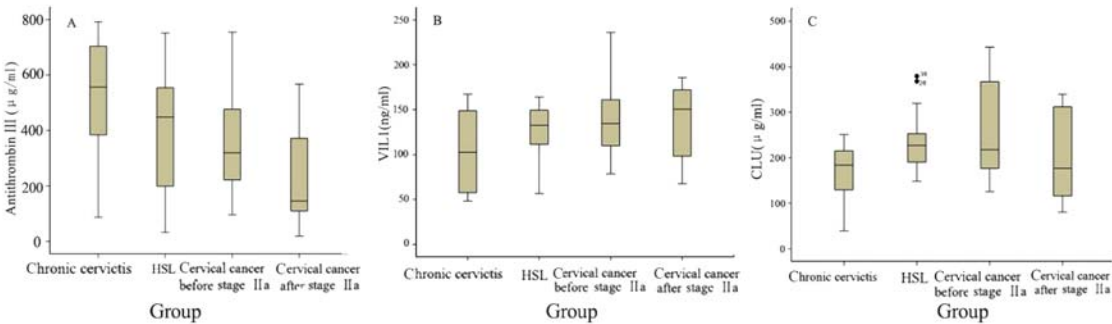


图1 不同宫颈病变组患者的ATⅢ、VIL1和CLU表达含量动态变化的箱式图分析
Figure1 Boxplot analysis of the dynamic changes of plasma proteins ATⅢ, VIL1 and CLU expression in patients with different cervical lesions

2.2 血浆ATⅢ、VIL1和CLU的表达含量的相关性分析结果

为了明确每一个差异具有统计学意义的蛋白之间是否有关联性，对不同蛋白之间进行相关性分析，发现这三种蛋白之间均无关联性，见表2。

表2 伴随着宫颈病变的候选血浆蛋白质含量变化的相关性分析

Table2 Correlation analysis of the dynamic changes of different candidate plasma proteins content with the development of cervical lesions

Proteins	VIL1		AT Ⅲ		CLU	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
VIL1	—	—	0.008	0.942	0.152	0.184
AT Ⅲ	0.008	0.942	—	—	-0.125	0.264
CLU	0.152	0.184	-0.125	0.264	—	—

3 讨论

近年来，高通量蛋白质组学技术以前所未有的速度进展，为人类肿瘤的早期预警和分子诊断提供了新的机遇，尤其是为肿瘤标志物的发现提供了巨大前景^[5]。本研究在前期蛋白质组学研究中，通过宫颈癌特异性改变的候选血浆蛋白指标筛查，以及生物信息学生物标志物筛查分析，确定3种候选预警蛋白ATⅢ、VIL1和CLU，对其动态变化和有效性进行了验证。

ATⅢ是一种α2-球蛋白，是凝血酶和其他丝氨酸蛋白酶的生理性抑制剂，已成功用于弥散性血管内凝血的治疗。本研究结果中ATⅢ表达含量随着宫颈病变进程加重而减少（ $P<0.05$ ）。认为在肿瘤阶段可能出现复杂的凝血-抗凝-纤溶系统的改变，总体的高凝和抗凝功能降低，纤溶功能低下与继发纤溶亢进可交替出现，表现为复杂的血栓前状态，这种状态有利于癌栓形成，易于癌细胞的黏附、浸润和转移^[6]。并且ATⅢ是肝脏合成的主要抗凝物之一，其在肿瘤患者中表达降低，多数学

者认为是消耗增加或肝脏合成不足所致^[7]。但是近年来研究发现，抗凝血酶具有抗血管新生、抑制细胞增殖等抗肿瘤作用^[8]。

CLU存在于多种体液中，比如精液、尿液、乳液、脑脊液及血清，同时发现它参与了细胞膜的稳定、促进生殖、脂类的运输、补体的调节等^[9]许多生理功能。研究表明CLU与细胞凋亡有着密切的关系，是一种凋亡抑制因子^[10]。CLU在前列腺癌、肾癌、膀胱癌等泌尿系统肿瘤和乳腺癌、胰腺癌、淋巴瘤等表达上调^[11]。本研究发现CLU随着宫颈病变进程的发展其表达含量逐渐增高，宫颈炎组（对照）与CINⅡ~Ⅲ、宫颈癌早期组相比差异有统计学意义（ $P<0.01$ ），提示其表达增高可以作为癌前病变的早期预警指示。

VIL1是一种能够使肌动蛋白成束聚集在微绒毛组成结构上起核心作用的肌动蛋白连接蛋白之一^[12]。研究发现，VIL1在胃肠道癌、胰腺癌、胆囊癌和胆管癌呈高表达^[13]，其表达仅限于上皮性肿瘤而不表达于肉瘤、黑色素瘤、淋巴瘤，具有严格的组织特异性。VIL1在炎症疾病和肿瘤的发生发展过程中，发生了质和量的改变^[14]。本研究发现VIL1在宫颈炎患者血浆中低表达，宫颈癌晚期表达含量最多，其表达水平随着宫颈病变的进程逐渐升高，含量水平变化与宫颈病变恶性进程呈正相关（ $P<0.01$ ），提示VIL1蛋白高表达对肿瘤分化程度及组织转移来源的鉴别有一定的价值。

ATⅢ、VIL1和CLU表达含量之间的动态变化无关联性，可能由于他们在肿瘤进程中的功能不同，在表达调控通路中无相关性。

综上所述，ATⅢ、VIL1和CLU的表达含量动态变化与维吾尔族妇女宫颈癌发生发展进程密切相关，可以成为宫颈癌早期诊断的血浆候选预警蛋白标志物。

参考文献：

[1] Liu KJ, Liu JW, Li XR, *et al.* Epidemiology study of risk factors on Uigur and Han cervical cancer in Xinjiang[J]. Xinjiang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008, 31(10):1335-8. [刘开江, 刘继文, 李晓荣, 等. 新疆维, 汉妇女宫颈癌发病危险因素的流行病学研究[J]. 新疆医科大学学报, 2008, 31(10):1335-8.]

[2] Lalai•Suzuke,Peng YH,Zhou K,*et al.*The analysis of pathogenetic tendency of cervical cancer in various ethnic women in Xinjiang[J].Xinjiang Yi Ke Da Xue Xue Bao,2006,29 (7):569-71. [拉莱•苏祖克, 彭玉华, 周康, 等. 新疆不同民族宫颈癌发病趋势分析[J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(7):569-71.]

[3] Zhang GQ, LIU KJ, Lai XJ, *et al.* Distribution of malignant tumor patients in hospital from 1989 to 2002 in the Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University[J]. Xinjiang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2003, 26(4):393-4. [张国庆,刘开江,赖小军,等.新医大附属肿瘤医院1989~2002年住院病人恶性肿瘤分布[J].新疆医科大学学报, 2003, 26(4):393-4.]

[4] Hao Z,Liu HM,Haimiti•Abudulimu.Expression of HSP90 and HPV16 in cervical cancer in Urghur women[J].Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu,2010,37(1):74-6,80.[郝治,刘红梅,海米提•阿布都力木.维吾尔族妇女宫颈癌组织中HSP90的表达及其与HPV16的相关性[J].肿瘤防治研究,2010,37(1):74-6,80.]

[5] Sölétormos G,Duffy MJ,Hayes DF, *et al.*Design of tumor biomarker-monitoring trials:a proposal by the European Group on tumor markers[J].Clin Chem,2013,59(1):52-9.

[6] Zhang L,Tang HQ.Changes and clinical significance of coagulation markers in patients with gastric cancer[J]. Jian Yan Yi Xue Yu Lin Chuang,2012, 9(2):166-7,169. [张琳, 唐沪强. 胃癌患者凝血指标变化及临床意义[J]. 检验医学与临床, 2012,9(2):166-7,169.]

[7] Rickles FR.Mechanisms of cancer-induced thrombosis in cancer[J]. Pathophysiol Haemost Thromb,2006, 35(1-2):103-10.

[8] Chen N, Xu K. Application and prospect of Heparin antithrombin in cancer therapy[J]. Chongqing Yi Xue,2011,40(20):2062-4.[陈楠, 徐昆. 肝素抗凝血酶III在肿瘤治疗中的应用与展望[J]. 重庆医学, 2011,40(20):2062-4.]

[9] Lee S,Hong SW,Min BH,*et al.*Essential role of clusterin in pancreas regeneration[J].Dev Dyn,2011,240(3):605-15.

[10] Ekici S,Eroğlu A,Doğan Ekici AI,*et al.*Clusterin immunoreactivity as a predictive factor for progression of non-muscle-invasive bladder carcinoma[J]. Urol Int,2011,86(1):31-5.

[11] Zhang JJ,Yu YL,Du Y.The research progression of clusterin in tumor[J].Neimenggu Yi Xue Za Zhi,2011,43(4):445-8.[张建举, 于跃利,杜颖.Clusterin在肿瘤中的研究进展[J].内蒙古医学杂志,2011,43(4):445-8.]

[12] Nakamura E,Iwakawa M,Furuta R,*et al.* Villin1, a novel diagnostic marker for cervical adenocarcinoma[J].Cancer Biol Ther,2009, 8(12):1146-53.

[13] Zavros Y,Eaton KA,Kang W,*et al.*Chronic gastritis in the hypochlorhydric gastrin-deficient mouse progresses to adenocarcinoma[J].Oncogene,2005,24(14):2354-66.

[14] Kennedy MT,Jordan RC,Berean KW,*et al.*Expression pattern of CK7, CK20, CDX-2, and villin in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma[J]. J Clin Pathol,2004,57(9):932-7.

[编辑：安 凤；校对：黄园玲]